蚕类核酸的研究

1. 氯仿去污剂法分离纯化蚕类DNA

陈元霖　郑子修　叶文娟

（中国科学院昆明动物研究所）

李桂兰　吕慧梅

（南京大学生物系生化教研组）

摘　要

应用氯仿去污剂的方法，从蚕蛹和幼虫制备DNA，所得DNA制品内没有或者只有微量的RNA和蛋白质。DNA是双链高分子，在蚕类上进行的试验表明这种DNA具有遗传转化作用。

1944年Avery等人[6]证实引起细菌转化的物质是DNA，揭开了分子遗传学研究的序幕。现今，DNA的分离与分析技术的研究仍是分子遗传学研究的重要组成部份。例如，在许多遗传转化试验中往往得不到予期的结果，有些作者认为这可能与DNA的分离方法及其性质有关[7,8]。生物材料是极其多种多样的，从不同材料分离DNA有时要用不同的方法。因此，探讨从不同的生物材料中分离DNA的方法并比较其性质是有意义的。在国内，这方面的工作还刚刚开始[1,2,3]。

昆虫不仅种类繁多，与人类的关系也非常密切。对于昆虫核酸的研究，在理论和实践上都有重要意义。本文介绍一个以蚕类的蛹和幼虫制备具有遗传转化作用的DNA方法。

材 料 和 方 法

一、材料：

蓖麻蚕（*Attacus cynthia ricini*）和家蚕（*Bombyx mori*. *L.*）的蚕蛹和第三

本文于1979年10月13日收到。

至四令幼虫。蚕蛹和幼虫都是健康的。

二、方法：

根据Marmur. 方法[9] 做了修改。

（1）粗制品的制备

蚕蛹或幼虫用蒸馏水洗涤后，置20°C—20°C予冷30—40分钟，取出并加入少量SSC—EDTA溶液（0.15*M*氯化钠—0.015*M*柠檬酸钠—0.01*M*乙二胺四乙酸二钠盐），快速匀浆30秒钟，过滤并用SSC—EDTA溶液冲洗残渣。滤液以2500转/分速度在冷冻离心机内离心15分钟。弃去上层液，留取沉淀。再次加入SSC—EDTA溶液，搅拌和离心（如此重复一次）。将沉淀物悬浮于1—2倍体积10×SSC溶液中（1.5*M*氯化钠—0.15*M*柠檬酸钠）。加入1/9体积25%SDS（磺酸十二烷钠，最终浓度为2.5%）。振荡20分钟，在60°C水浴中处理10分钟，依次加入1/5体积5M $NaClO_4$和等体积氯仿—异戊醇（24:1v/v），振荡30分钟，离心30分钟（3000—3500转/分）。收取上层水相，加入1.5—2倍体积冷的乙醇（95%）沉淀。纤维状DNA用玻璃棒缠绕出后，在70%至无水乙醇内梯度洗涤。最后用丙酮洗涤脱水，真空干燥。

2.精制品的制备

（1）酶纯化：

将DNA粗制品溶解于0.1×ssc溶液中（0.015M氯化钠—0.0015*M*柠檬酸钠），配成10毫克/毫升浓度的DNA溶液。加入1%α—淀粉酶（W/W）和0.5%核糖核酸酶（RNase）（W/W）（先溶解在*Tris—HCl*，*pH7.4*缓冲液中，煮沸处理以灭活可能污染的去氧核糖核酸酶）。在37°C孵育30分钟后，加入等体积氯仿—异戊醇去蛋白4—5次。收集上层水相，用1.5—2倍体积95%冷乙醇沉淀，用玻璃棒缠绕出纤维状DNA。经不同浓度乙醇洗涤，最后再用丙酮洗涤脱水，真空干燥。

（2）异丙醇纯化：

将经过α—淀粉酶和RNase初步纯化后的DNA制品溶解在EDTA—乙酸盐溶液中（0.001M EDTA—3M NaAC），配成浓度5毫克/毫升的DNA溶液，以1比0.6体积（v/v）缓缓加入异丙醇使DNA沉淀，然后得纤维状DNA。用玻璃棒缠绕出来，按上述步骤经乙醇，丙酮脱水，真空干燥后在低温下保存。

简述蚕类DNA提取过程如下：

蚕蛹或幼虫
↓ —20°C予冷30—40分钟，加入SSC—EDTA溶液，匀浆，2500转/分离心15分钟，收集沉淀。再洗沉淀一次。
核碎片
↓ 加10×ssc溶液搅匀，加1/9体积25%SDS振荡20分钟，60°C水浴保温10分钟，加1/5体积5M $NaClO_4$＋等体积氯仿—异戊醇，振荡30分钟。3000—3500转/分离心30分钟，上清液用95%乙醇沉淀，脱水，真空干燥。
粗制DNA

↓ 溶解于0.1×ssc溶液，以RNase，α—淀粉酶处理，氯仿—异戊醇去旦白（共四次），3000—3500转/分，离心30分钟，上清液用95%乙醇沉淀，脱水，真空干燥。

精制DNA I

↓ 溶解于0.001M EDTA—3M NaAC中，加0.6体积异丙醇沉淀，脱水真空干燥。

精制DNA Ⅱ

实 验 结 果

一、DNA制品的纯度分析

DNA用二苯胺法测定[10]，RNA用3.5——二羟基甲苯测定[5]，蛋白质用Lowry's法测定[11]。不同来源精品DNA的化学测定结果见表1。

表1. 不同来源DNA的化学测定

DNA 来源	DNA(%)	RNA(%)	旦白质(%)
蓖麻蚕蛹	69.0	测不出	0.40
蓖麻蚕幼虫	85.0	测不出	2.20
家蚕蛹	82.0	测不出	0.85
家蚕幼虫	89.0	测不出	0.90

二、DNA制品的紫外吸收特点和碱基比例分析。

不同来源的DNA制品（经过酶和异丙醇纯化）的紫外吸收比值列于表2

表2. 不同来源DNA吸收光谱性质比较

DNA 来源	A260/A280	A260/A230
蓖麻蚕蛹	1.92	2.59
蓖麻蚕幼虫	1.88	2.19
家蚕蛹	1.90	2.31
家蚕幼虫	1.88	2.55

吸收光谱测定，以家蚕蛹DNA为例见图1。吸收高峰在259毫微米，在230毫微米处有个最低点，呈现出核酸的紫外吸收光谱曲线。DNA的熔点温度测定结果如图2，表示了典型的DNA熔点曲线，Tm是84°C。

熔点温度Tm＝84°C 代入下式：

$$G\text{—}C\% = 2.44 \times (Tm - 69.3)$$

从而计算出G—C碱基对所占百分比为35.9%。

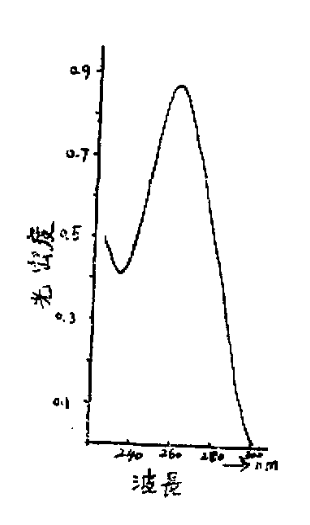


图 1　家蚕蛹DNA紫外吸收曲线

图 2　家蚕蛹DNA熔点曲线

三、聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

家蚕DNA聚丙烯酰胺凝胶电泳，呈现一条电泳带，测得的R_f值为0.27，根据Gregson的方法[12]，DNA分子量为1.15×10^{6}—1.90×10^{6}。

DNA聚丙烯酰胺凝胶带在553毫微米处扫描，呈现出单一吸收峰（图3）。

四、遗传转化作用试验

我们以具有着色复眼的蓖麻蚕和家蚕品系的蛹和幼虫制备DNA从背脉管注入具有相对隐性性状（白眼）的家蚕五令幼虫体内，多次发现受体蛾子的复眼色发生了变异[12,13]；接受蓖麻蚕DNA的试验组内，具有复眼色变异的个体为1.6%；接受其他家蚕品系DNA的试验组，变异个体的百分比为3.7—5.9%[12]。

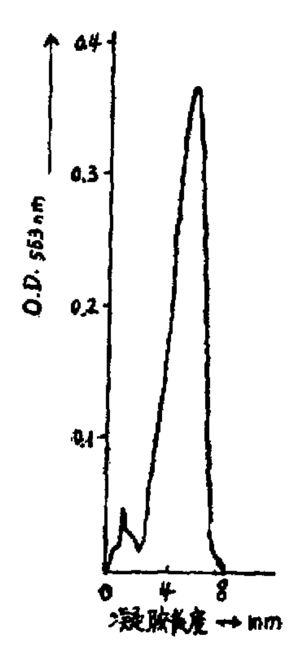


图 3　家蚕蛹DNA聚丙烯酰胺凝胶扫描图谱

Studies of Silkworm (Bombyx mori) Nucleic Acids

1. Isolation and purification of DNA by the method of chloroform and detergent.

Chen Yuan-lin, Zheng Zi-xiu, Ye Wen-juan

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Li Guei-lan, Lu Hui-mei

(Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, Nanking University)

Abstract

The preparation of DNA was carried out ftom the pupa and larve of silkworm by the method of chloroform and detergent. The DNA preparation obtained was determined to have little or no RNA and protein. DNA is double stranded high molecule. The result of these experiments showed that the DNA preparation was capable of transformation.

参 考 文 献

〔1〕 实验生物研究所三室细胞组：小牛胸腺 DNA 的提取和分析。生物化学与生物物理学进展。5期，3—6页，1977。

〔2〕 曾以申：几种植物DNA的纯化及其某些性质。生物化学生物物理学报。10卷，4期391—397页。1978。

〔3〕 陈永强：植物组织 DNA 提取的一种快速方法。遗传。1期，39—40页，1979。

〔4〕 陈元霖，郑子修，胡宝民：蓖麻蚕去氧核糖核酸诱导家蚕遗传变异的初步研究。遗传学报 6 卷，1期，83页，1979。

〔5〕 Chadra, p., Appel. W.：分子生物学方法。李德申译，科学出版社，94—96页，1977。

〔6〕 Avery. O. T. et al *J. Exp. med.* 79. 137. 1944.

〔7〕 Астауров. Б.Л. и др. ДАН СССР 134. 2. 449. 1960.

〔8〕 Кок.И.П; Нуклеиновые кислоты насемкомых и вирусов. Наукова Думка. стр. 42—49. 1973.

〔9〕 Marmur. J; *J. Mol. biol.* 3. 208. 1961.

〔10〕 Burton. K; *Biochem. J.* 62. 315—323. 1965.

〔11〕 Lowry. O. H. et al. et al *J. Biol. chem.* 193. 265. 1951.

〔12〕 Gregson. S. *Anal. Biochem* 48. 613. 1972.